

巴西橡胶树 *TIM23-1* 基因克隆、进化及表达分析

陈江淑^{1,2}, 邓治², 刘辉², 范玉龙¹, 姜达¹, 夏立琼¹, 夏志辉^{1,*}, 李德军^{2,*}

¹海南大学农学院, 海口570228; ²中国热带农业科学院橡胶研究所, 农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南儋州571737

摘要: 本研究采用RACE技术, 从巴西橡胶树中鉴定出一个线粒体内膜转位因子 *TIM23* 基因。该基因全长cDNA为898 bp, 最长开放阅读框567 bp, 预测编码蛋白包含188个氨基酸; 序列比对分析发现, 该基因编码蛋白具有转膜区和PRAT结构域, 与拟南芥 *TIM23-1* 蛋白具有较高的相似性, 将该基因命名为 *HbTIM23-1*。实时定量RT-PCR分析结果表明, *HbTIM23-1* 在巴西橡胶树胶乳、叶片、树皮、雄花、雌花、花药中均有表达。在橡胶树叶片不同发育时期, *HbTIM23-1* 表达存在变化。与健康橡胶树相比, 死皮橡胶树胶乳中 *HbTIM23-1* 表达量明显下降。研究发现 *HbTIM23-1* 表达受干旱和低温处理调控, 表明 *HbTIM23-1* 可能在巴西橡胶树干旱和低温胁迫应答及死皮中发挥作用。

关键词: 巴西橡胶树; 线粒体内膜转位因子23; 死皮; 基因克隆; 表达分析

Cloning, Phylogenetic and Expression Analyses of *TIM23-1* Gene in *Hevea brasiliensis*

CHEN Jiang-Shu^{1,2}, DENG Zhi², LIU Hui², FAN Yu-Long¹, JIANG Da¹, XIA Li-Qiong¹, XIA Zhi-Hui^{1,*}, LI De-Jun^{2,*}

¹College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China; ²Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture, Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: In this study, a full-length cDNA sequence of *TIM23* gene was cloned from *Hevea brasiliensis* with the rapid-amplification of cDNA ends (RACE) method, and the gene was named as *HbTIM23-1*. The full length cDNA of *HbTIM23-1* is 898 bp in size with a 567 bp open reading frame, encoding a deduced polypeptide of 188 amino acids. The deduced *HbTIM23-1* contains a predicted transmembrane region and preprotein and amino acid transporter (PRAT) domain and indicates high identity to *AtTIM23-1* protein. Real-time RT-PCR analyses indicated that *HbTIM23-1* was expressed in latex, barks, leaves, barks, male flowers, female flowers and anthers. With the development of leaves, the *HbTIM23-1* expression showed a significant change. Compared with healthy rubber tree, *HbTIM23-1* was down-regulated in tapping panel dryness (TPD) rubber tree latex. The expression of *HbTIM23-1* was regulated by drought and low temperature treatments, suggesting that *HbTIM23-1* might play important roles in drought and temperature responses as well as TPD in *H. brasiliensis*.

Key words: *Hevea brasiliensis*; *TIM23*; tapping panel dryness; gene cloning; expression analysis

线粒体在细胞的生命活动中发挥着重要作用, 它不仅是细胞内氧化磷酸化和三磷酸腺苷(ATP)合成的主要场所, 为细胞活动提供能量, 还参与细胞代谢的调节、细胞周期的调控、细胞发育、抗病毒和细胞凋亡等重要的生命活动(Schatz 2007)。线粒体中含有约1 000种蛋白质, 但其蛋白合成能力有限, 约有99%的蛋白由细胞核DNA编码, 这些蛋白质在细胞质核糖体上合成, 再运到线粒体的内膜、外膜、基质或膜间隙中(Bauer等2000; Pfanner和Geissler 2001)。该生物学过程由众多分子机器组成的线粒体蛋白质转运系统参与并完成。

近年来的研究表明, 在线粒体外膜和内膜上

均存在着一系列与蛋白质运转有关的膜蛋白质复合体, 这些复合体通常被称为转位因子(translocator, 或translocase)。这些转位因子主要包括: 线粒体外膜上的TOM (translocases of outer mitochondrial membrane)复合体和SAM (sorting and assembly machinery)复合体及内膜上的 *TIM23* (translocases

收稿 2015-05-19 修定 2015-09-09

资助 国家自然科学基金(31270651和31200514)和中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费专项(163002-2015003)。

* 共同通讯作者(E-mail: zhxia-111@163.com; dragonldj@163.com; Tel: 0898-23301174)。

of inner mitochondrial membrane)复合体和TIM22复合体(Pfanner等2004)。在细胞质中,由核DNA合成的线粒体蛋白质由线粒体膜上的转位因子介导,并通过它们形成的膜孔进入线粒体。

TIM23复合物是线粒体内膜主要的转运与装配复合物。在行使功能的过程中, TIM23复合物可以游离态和与PAM复合物的结合态(TIM23-PAM复合物)两种形式存在,上述两种不同状态代表其参与前体蛋白的不同转运途径(Popov-Celeketi等2008; Mokranjac和Neupert 2010)。TIM23复合物主要由TIM23、TIM50、TIM17和TIM21四个亚基组成,与其他3个亚基相比, TIM21是TIM复合物行使功能非必需的。TIM23形成TIM23复合物的跨膜通道,其N末端为暴露在膜间隙的一段亲水结构域,在特定条件下可与外膜相互作用,并对TIM23的二聚化和底物结合起重要作用(Truscott等2001)。虽然TIM17和TIM23同源,但TIM17的N末端只有一段很短的片段暴露在膜间隙中, TIM23和TIM17组成TIM23复合物整合跨膜中心,该跨膜中心在TIM23复合物孔道开放中发挥着重要作用(Meier等2005)。TIM50可通过其N末端跨膜片段锚定于内膜上,在膜间隙侧含有一个较大的结构域。当前体蛋白出现在膜间隙侧后,前体蛋白便同该结构域结合并被转移至TIM23复合物的跨膜通道中(Mokranjac等2003, 2009)。当前体蛋白穿过TIM23复合物的跨膜通道后,由运输驱动蛋白PAM复合物负责完成其向基质转运的过程。此时,与PAM复合物结合的TIM23复合物组分中不存在TIM21 (Popov-Celeketi等2008)。

在酵母中,遗传学的方法被用于分析两个TIM复合物的特性(Rehling等2001)。最先被鉴定的TIM17:23复合物负责切开目标氨基酸延伸蛋白的输入, TIM22负责将线粒体的代谢物运输蛋白,如ADP/ATP和磷酸的转运蛋白插入内膜(Rehling等2001)。被线粒体目标信号激活后, TIM23和TIM22复合物在内膜形成电压敏感通道(Truscott等2001; Kovermann等2002)。TIM17、TIM23和TIM22都包含4个跨膜区及C和N端,对人TIM17:23复合物结构和遗传特性研究结果表明该转位因子在真核生物中高度保守(Rassow等1999)。多种生物中的TIM22和与之相关的小TIM蛋白(TIM8、

9、10和13)序列也高度保守(Bauer等1999)。

对植物蛋白输入过程的研究已有十年之久,但对各种输入成分作用及鉴定的研究进展仅处于初级阶段。番茄TIM9和TIM10是载体蛋白进入内膜所必须的(Lister等2002)。拟南芥有17个基因编码前蛋白和氨基酸转运体(PRAT)蛋白(Rassow等1999),其中10个蛋白定位于线粒体,6个定位于质体,1个蛋白属线粒体和质体双定位(Murcha等2007)。定位于线粒体的蛋白进化分析显示编码TIM17、TIM23和TIM22未知功能蛋白个数分别为3、3和2 (Murcha等2003)。拟南芥的3个TIM23基因有2个位于第1染色体,即*AtTIM23-1*和*AtTIM23-2*,另一个位于第3染色体,*AtTIM23-3*,3个预测蛋白的相似性为35% (Murcha等2003)。与酵母TIM23相比,3个拟南芥TIM23都缺少前34个氨基酸;3个拟南芥TIM23的基因均有表达,且在不同组织和发育时期存在差异。互补实验表明:当前蛋白和转运子结构域存在时,拟南芥TIM23基因可互补酵母TIM23基因删除突变体。拟南芥TIM17和TIM23输入实验显示两者都包含与线粒体内膜结合的内部信号(Murcha等2003)。拟南芥NADH脱氢酶B14.7和TIM23-2参与呼吸复合体I和TIM17:23, NADH脱氢酶B14.7缺失表型致死,而*AtTIM23-2*表现为非致死。过表达*AtTIM23-2*植株呈现严重延迟生长,显示*AtTIM23-2*多少与呼吸复合体负相关(Wang等2012)。

天然橡胶同钢铁、石油和煤炭并称为四大工业原料,是关系国计民生的基础产业和重要战略物资。世界上有2 000多种产胶植物,巴西橡胶树(简称橡胶树)具有产胶量高、品质好、经济寿命长、采胶方便和生产成本低等优点,成为唯一一种人工栽培的重要产胶植物,由其生产的天然橡胶占世界天然橡胶总产量的90%以上。我国属非传统植胶区,橡胶树生长周期内经常遭受低温、台风、季节性干旱等逆境条件,使橡胶树胶乳产量和生长受到影响。除上述逆境外,死皮也是我国天然橡胶生产的主要限制性因子,致使胶乳产量下降。为了探讨TIM23基因在巴西橡胶树低温、干旱和死皮中的作用,我们利用cDNA末端快速扩增(rapid-amplification of cDNA ends, RACE)技术,从橡胶树中鉴定到一个*HbTIM23-1*基因,并分

析该基因在不同组织、叶片不同发育时期、死皮和健康橡胶树胶乳、干旱和低温处理条件下的表达模式及TIM23-1进化关系, 以期为进一步揭示HbTIM23-1在橡胶树中功能奠定基础。

材料与方法

1 植物材料与不同处理

橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)品系热研7-33-97由中国热带农业科学院橡胶研究所自主培育, 于1990年定植于中国热带农业科学院试验场五队, 采用S/2 d/4 (1/2螺旋割线, 每4 d割一刀)加1.5%乙烯利刺激割制采集胶乳。不同组织、叶片不同发育时期及健康和死皮橡胶树胶乳均取自该材料, 选用剖面2 cm至1/4割线长度不排胶的橡胶树为死皮树材料。

克隆载体pMD18-T、DNase I、*Pyrobest*TM DNA聚合酶、qPCR试剂、DNA Markers购自大连宝生物公司, 2×*Taq* PCR Master Mix聚合酶购自北京天根公司, RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit购自Fermentas公司, SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 购自Clontech公司。*Escherichia coli* DH5α为本课题组保存, 引物合成和测序均委托上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

干旱和低温处理选用橡胶树品系热研7-33-97组培苗, 将组培苗根部培养基洗净放入清水中, 在湿度80%, 温度30 °C, 12 h光照(光照强度480 μmol·m⁻²·s⁻¹), 12 h黑暗培养3 d后进行低温(8 °C)处

理, 具体参照安泽伟等(2010)方法进行; 干旱处理参照Zhang等(2012)方法进行, 采用16%的PEG8000模拟干旱条件, 以不作任何处理的组培苗为对照, 分别采集处理后0、3、24和48 h叶片。

2 总RNA提取及cDNA第一链合成

参照Tang等(2007)和Kiefer等(2000)的方法提取橡胶树树皮、胶乳、叶片、花等组织总RNA, 利用DNase I (大连宝生物公司)去除RNA中残留的少量DNA后, 对总RNA进行定量和电泳检测。样品cDNA第一链合成按照RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)说明书提供的方法进行。

3 HbTIM23-1全长cDNA克隆、序列及进化分析

根据橡胶树TIM23-1基因部分片段设计5'和3' RACE特异性引物(表1), 之后按照SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)说明书进行5'和3' RACE操作。5' RACE两轮扩增程序为94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 72 °C延伸2 min, 5个循环; 94 °C变性30 s, 70 °C退火30 s, 72 °C延伸1.5 min, 5个循环; 之后是94 °C变性30 s, 68 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 25个循环; 72 °C延伸7 min。3' RACE第一轮扩增条件为94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 25个循环; 72 °C延伸7 min。用3' RACE第一轮扩增稀释产物为模板进行第二轮PCR扩增, 扩增程序同第一轮, 扩增产物经胶回收后连接到pMD18-T载体, 挑取阳性克隆经PCR和酶切验证后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

表1 HbTIM23-1基因克隆和表达分析所用引物序列

Table 1 The primers used in gene cloning and expression analyses of HbTIM23-1

| 引物名称 | 引物序列(5'→3') | 用途 |
|---------------|-------------------------|-----------------|
| HbTIM23-1-5R1 | CAGTTTCAACGTAICGGTGG | 5' RACE |
| HbTIM23-1-5R2 | GAGATTCTTCGGTGAAGAGG | |
| HbTIM23-1-3R1 | CCTCTTCACCGAAGAATCTC | 3' RACE |
| HbTIM23-1-3R2 | CCACCGATACGTTGAAACTG | |
| HbTIM23-1F | GCAAAAAAAAACTCTTAAGGCTC | 验证cDNA全长 |
| HbTIM23-1R | ACAAGTTGAAAATTTTCATCAGG | 扩增内参 |
| Hb18SF | GCTCGAAGACGATCAGATAAC | |
| Hb18SR | TTCAGCCTTGCGACCATAAC | 检测HbTIM23-1表达水平 |
| HbTIM23-1-RTF | GGTGAATAGGATCTCAACTC | |
| HbTIM23-1-RTR | CTATCCGTAAC TGCCACAAC | |

根据获得的*HbTIM23-1*序列设计正反向引物HbTIM23-1F和HbTIM23-1R (表1), 用Pyrobest™ DNA酶进行PCR扩增以验证*HbTIM23-1*全长序列。扩增程序为94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 35个循环; 72 °C延伸7 min。回收扩增产物后连接pMD18-T载体, 挑取阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序。

利用NCBI的ORF finder查找*HbTIM23-1*最长开放阅读框。通过BLAST进行序列比对分析, 选择与HbTIM23-1同源的其他物种PRAT家族氨基酸序列, 分别用ClustalX 2和MEGA 6.06软件对PRAT家族蛋白进行序列多重比对和进化树分析。

4 *HbTIM23-1*表达模式分析

采用罗氏公司的LightCycler2.0实时荧光定量RT-PCR系统分析*HbTIM23-1*基因表达模式。取不同样品逆转录合成cDNA第一链, 稀释5倍后为实时定量分析模板, 反应体系为20 μL, 包括2 μL模板、10 μL 2×SYBR Premix、10 μmol·L⁻¹的上游和下游荧光定量特异引物各0.3 μL (终浓度为0.15

μmol·L⁻¹)。PCR反应程序如下: 94 °C预变性30 s; 94 °C变性5 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸20 s, 45个循环; 72 °C延伸7 min。以橡胶树18S rRNA基因作为内参基因, 序列见表1。每个样品设3个重复, 利用LightCycler 4.05自动进行基线和Cp值分析, 计算*HbTIM23-1*基因的相对表达量。

实验结果

1 *HbTIM23-1*克隆及序列分析

在分析橡胶树转录组测序数据时, 我们发现一条与拟南芥TIM23-1基因高度相似的序列。根据该序列设计RACE特异引物, 利用RACE、PCR和测序技术获得该基因5'端和3'端序列, 拼接该基因已知序列、5'端和3'端序列得到该基因全长cDNA为898 bp, 该基因5'和3'非编码区分别长68和263 bp, 最长开放阅读框567 bp, 预测编码蛋白包含188个氨基酸残基(图1)。该基因预测编码蛋白与拟南芥TIM23-1、TIM23-2和TIM23-3一致性分别为74%、72%和51%, 因此, 将从巴西橡胶树中得到的基因命名为*HbTIM23-1*。

```

gcaaaaaaaaaactcttaaggctctctgcaaccagattccacctctacctgaccttaaccctaaactaaaATGGCTCGCTCT 80
1      M A R S
GGTTCAGATCAGAGCGCACACCAATCCCCACAGGGCCGCTCTACAACCCTTATCAAGATCTAAACATTCGAAT 160
5      G S D H E P H H T Q S P Q G R L Y N P Y Q D L N I P I
CCAGAACCTCTACCAGCTCCCAACCTCCGGAGTTCCTTCCACCGAAGATCTCTCCACGCGCCGCTCTGGGGCG 240
32     Q N L Y Q L P T S P E F L F T E E S L H Q R R S W G
AAAATCTGACCTTTTATACTGTTCTGCATATCTCGCCGCTCCATCGGCGGTCTTCAGTTGGGTTGTTCTCCGCCCTC 320
58     E N L T F Y T G S A Y L A A S I G G A S V G L F S A L
AAATCCTTGAATCCACCGATACGTTGAAACTGAAGGTGAATAGGATTCCTCAACTTCTCCGCCCATTCGGGACGAGTCTG 400
85     K S F E S T D T L K L K V N R I L N S S G H S G R V W
GGGAAACCGGATCGGGTGTAGGATTGATCTATGCCATGACGGAGAGTGGAGTTGGCAGTTACGGATAGGACGATG 480
112    G N R I G V V G L I Y A M T E S G V V A V T D R D D
TGTGGACACGCTGGCTGCGGGGCTTGGGACGGGAGCTGTGTGCCGGGCGGAGAGGAGTGAAGTTCGGCGGCTGTGGCG 560
138    V W T S V A A G L G T G A V C R A A R G V R S A A V A
GGCGCGTTGGGAGGTTGGTGGCTGGGGCAGCGGTGGCGGGGAAGCAGACGTTGAAGAGGTATCGCATGATTTAAaatac 640
165    G A L G G L V A G A A V A G K Q T L K R Y A M I *
agagagaaagagctttgcaaattgagtttagttctgacttctaaattgttctacgattaccagttgtatctcttcaaat 720
tttgatcgtgaagtgttagccatataatggtattgattgtaagtttatgaatcatgatggttataagaatcttgaatc 800
aatgagactgatgaacatgctttgctaaatggaataccagattatcctgatgaaaaattttcaacttgtaaaaaaaaa 880
aaaaaaaaaaaaaaaaa 898

```

图1 *HbTIM23-1*核酸及推导的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide acid and deduced amino acid sequences of *HbTIM23-1*

小写字母表示非翻译区, 星号表示终止密码子。

2 多序列比对及系统发生分析

分析拟南芥TIM23蛋白发现, AtTIM23与AtTIM22和AtTIM17属前蛋白和氨基酸转运体(PRAT)家族, 我们对橡胶树TIM23-1、3个AtTIM23、2个AtTIM22、3个AtTIM17及酵母TIM17、TIM22和TIM23进行序列比对, 结果显示,

前蛋白和氨基酸转运体家族都含有预测转膜区域和PRAT结构域, 与其他区段相比, PRAT结构域保守性相对较高(图2)。在序列比对基础上, 对上述蛋白进行进化分析, 结果表明, 尽管TIM17、TIM22和TIM23同属于PRAT蛋白家族, 3类蛋白明显分为TIM17、TIM22和TIM23 3个分支。Hb-



图2 HbTIM23-1与其他PRAT蛋白序列比对

Fig.2 Amino acid alignment of HbTIM23-1 with other PRAT proteins

灰色背景为预测转膜区域, 双下划线部分为PRAT结构域。AtTIM23-1: NP_564028 (拟南芥); AtTIM23-2: NP_177419 (拟南芥); AtTIM23-3: NP_187131 (拟南芥); AtTIM17-1: NP_173460 (拟南芥); AtTIM17-2: NP_181277 (拟南芥); AtTIM17-3: NP_196730 (拟南芥); AtTIM22-1: NP_173268 (拟南芥); AtTIM22-2: NP_566368 (拟南芥); ScTIM23: NP_014414 (酵母); ScTIM22: NP_010064 (酵母); ScTIM17: NP_012392 (酵母)。

TIM23-1同拟南芥和酵母的TIM23为一个分支, 且与拟南芥3个TIM23蛋白中AtTIM23-1和AtTIM23-2的亲缘关系较近(图3)。

3 HbTIM23-1在不同组织及死皮和叶片不同发育时期的表达分析

以Hb18S rRNA为内参, 利用实时定量RT-PCR



图3 HbTIM23-1与其他PRAT蛋白的系统进化关系

Fig.3 Phylogenetic analyses of HbTIM23-1 and other PRAT protein

方法分析*HbTIM23-1*的表达模式。结果表明,*HbTIM23-1*在巴西橡胶树胶乳、叶片、雌花、树皮、雄花和花药组织中均有表达,在胶乳中表达最高,树皮中表达量最低(图4-A)。在叶片不同发育时期*HbTIM23-1*表达量存在变化,淡绿期和衰老期表达较高且相近,古铜期、变色期和稳定期表达量相当,且相对较低(图4-B)。

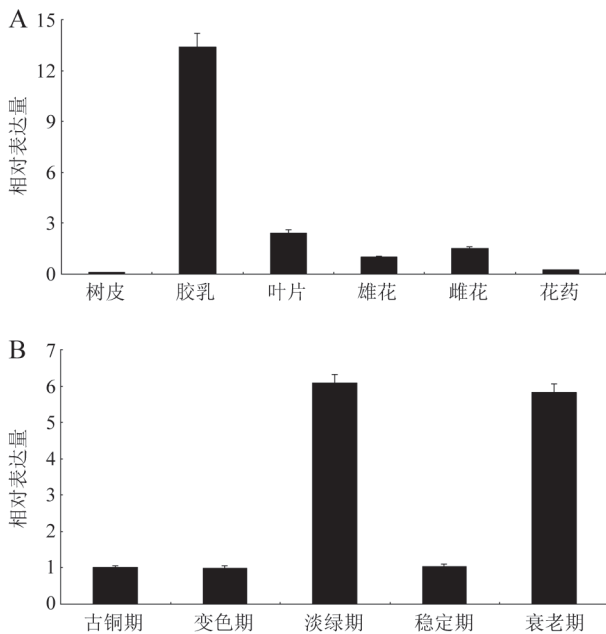


图4 *HbTIM23-1*不同组织(A)及叶片不同发育时期(B)的表达模式

Fig.4 *HbTIM23-1* expression patterns in different tissues (A) and different developmental stages of leaves (B)

4 *HbTIM23-1*在干旱和低温处理、死皮和健康橡胶树胶乳中的表达分析

由图5-A和B可见,低温和干旱处理均调控*HbTIM23-1*表达,但两者表达模式不同。低温处理3 h后,*HbTIM23-1*表达量有所下降,之后表达量明显升高,24和48 h表达量显著高于处理前水平(图5-A);在干旱处理条件下,*HbTIM23-1*表达在3 h明显升高,之后表达持续下降,48 h表达量下降至处理前1/2水平(图5-B)。相比之下,*HbTIM23-1*在对照不同时间点表达基本无变化。与健康橡胶树相比,*HbTIM23-1*在死皮橡胶树胶乳中表达量明显下降,说明*HbTIM23-1*与橡胶树死皮相关(图5-C)。

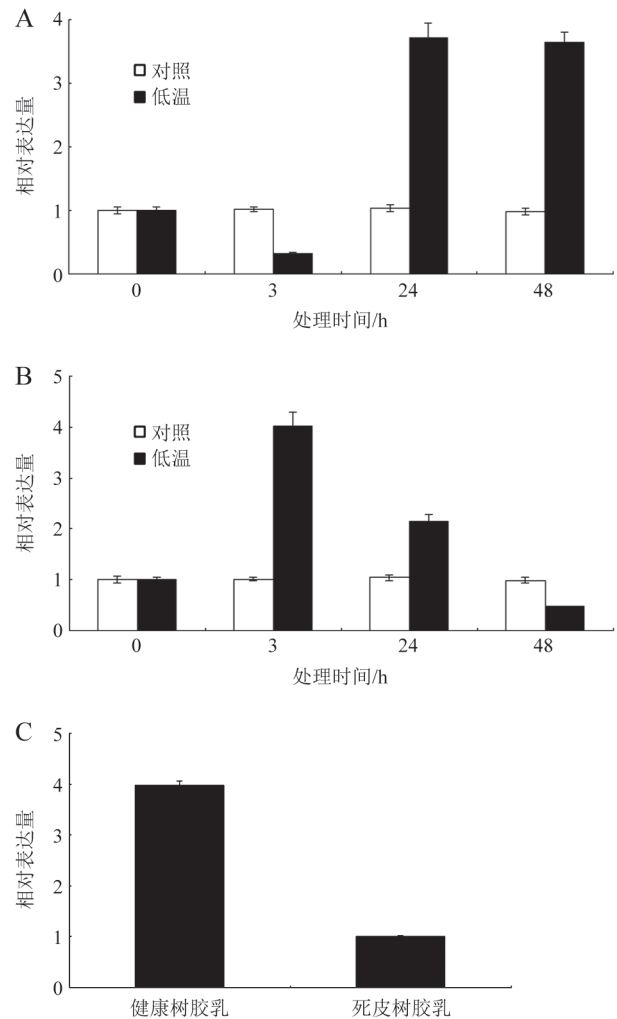


图5 *HbTIM23-1*在低温(A)和干旱(B)处理及死皮和健康橡胶树胶乳(C)中的表达模式分析

Fig.5 *HbTIM23-1* expression patterns under low temperature (A), drought (B) treatments as well as TPD and healthy rubber trees (C)

讨 论

线粒体是一种存在于真核细胞中由两层膜包被的细胞器,它不仅为细胞活动提供能量,还参与调控细胞代谢、细胞周期、细胞发育、抗病毒和细胞凋亡等重要的生命活动(Schatz 2007)。因线粒体自身合成蛋白数量有限,大量蛋白由细胞核DNA编码并转运到线粒体,蛋白的转运过程由线粒体蛋白质转运系统参与并完成。细胞核DNA编码进入线粒体对其行使功能至关重要。TIM23复合体是线粒体蛋白质转运系统的重要组成部分,

它主要由TIM23、TIM50、TIM17和TIM21 4个亚基组成。TIM23形成TIM23复合物的跨膜通道,并与TIM17组成TIM23复合物整合跨膜中心,在TIM23复合物孔道开放中发挥着重要作用。

尽管人们对TIM23蛋白的研究已有一些进展,但对其认识还远不清楚,在植物中尤为如此。本研究首次从巴西橡胶树中克隆了首个TIM23基因,命名为*HbTIM23-1*。鉴于拟南芥有3个TIM23基因,橡胶树是否还有其他TIM23成员还有待于进一步研究。序列比对发现橡胶树TIM23-1蛋白与其他前蛋白和氨基酸转运体家族蛋白相似,具有预测转膜区域和PRAT结构域,以上特征对橡胶树TIM23-1蛋白行使功能至关重要。*HbTIM23-1*与拟南芥和酵母的TIM23为一个分支,与AtTIM23-1的亲缘关系较近,氨基酸水平一致性高达74%,推测橡胶树TIM23-1蛋白与AtTIM23-1功能相似。

与拟南芥TIM23基因在不同组织和发育时期表达存在差异结果一致(Meier等2005),*HbTIM23-1*在不同组织和叶片不同发育时期表达同样存在变化。*HbTIM23-1*在胶乳、树皮、叶片、雄花、雌花和花药中均有表达,以胶乳中表达量最高,树皮中最低,说明*HbTIM23-1*可能在胶乳中功能相对重要。在橡胶树叶片不同发育时期*HbTIM23-1*表达存在变化,在淡绿期和衰老期表达较高,古铜期、变色期和稳定期基本一致,说明*HbTIM23-1*可能与橡胶树叶片发育相关。低温和季节性干旱是影响我国天然橡胶生产的主要逆境,研究发现低温和干旱均显著调控*HbTIM23-1*表达,说明*HbTIM23-1*可能参与橡胶树低温和干旱反应。与健康橡胶树相比,死皮树胶乳中*HbTIM23-1*表达量下降。Venkatachalam等(2009)报道*HbTOM20*在健康橡胶树胶乳中表达量上调。因TOM20是TOM复合物的的重要组成部分,TOM和TIM复合物同时参与蛋白进入线粒体过程。推测*HbTIM23-1*和*HbTOM20*表达下调可能影响线粒体蛋白转运,引起ATP水平降低和胶乳合成能力下降从而导致橡胶树死皮发生。当然,这一推测还有待于进一步实验验证。

参考文献

安泽伟,陈根辉,程汉,赵彦宏,谢黎黎,黄华孙(2010). 橡胶树冷应答转录组cDNA-AFLP分析. 林业科学, 46: 62-67

Bauer MF, Hofmann S, Neupert W, Brunner M (2000). Protein trans-

- location into mitochondria: the role of the complexes. Trends Cell Biol, 10: 25-31
- Bauer MF, Rothbauer U, Muhlenbein N, Smith RJ, Gerbitz K, Neupert W, Brunner M, Hofmann S (1999). The mitochondrial TIM22 preprotein translocase is highly conserved throughout the eukaryotic kingdom. FEBS Lett, 464: 41-47
- Kiefer E, Heller W, Ernst D (2000). A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. Plant Mol Biol Rep, 18: 33-39
- Kovermann P, Truscott KN, Guiard B, Rehling P, Sepuri NB, Muller H, Jensen RE, Wagner R, Pfanner N (2002). TIM22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. Mol Cell, 9: 363-373
- Lister R, Mowday B, Whelan J, Millar AH (2002). Zinc-dependent intermembrane space proteins stimulate import of carrier proteins into plant mitochondria. Plant J, 30: 555-566
- Meier S, Neupert W, Herrmann JM (2005). Conserved N-terminal negative charges in the Tim17 subunit of the TIM23 translocase play a critical role in the import of preproteins into mitochondria. J Biol Chem, 280 (9): 7777-7785
- Mokranjac D, Neupert W (2010). The many faces of the mitochondrial TIM23 complex. Biochim Biophys Acta, 1797 (6-7): 1045-1054
- Mokranjac D, Paschen SA, Kozany C, Prokisch H, Hoppins SC, Nargang FE, Neupert W, Hell K (2003). Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. EMBO J, 22 (4): 816-825
- Mokranjac D, Sichting M, Popov-Celeketi D, Mapa K, Gevorgyan-Airapetov L, Zohary K, Hell K, Azem A, Neupert W (2009). Role of Tim50 in the transfer of precursor proteins from the outer to the inner membrane of mitochondria. Mol Biol Cell, 20 (5): 1400-1407
- Murcha MW, Elhafez D, Lister R, Tonti-Filippini J, Baumgartner M, Philippar K, Carrie C, Mokranjac D, Soll J, Whelan J (2007). Characterization of the preprotein and amino acid transporter gene family in Arabidopsis. Plant Physiol, 143: 199-212
- Murcha MW, Lister R, Ho AY, Whelan J (2003). Identification, expression, and import of components 17 and 23 of the inner mitochondrial membrane translocase from Arabidopsis. Plant Physiol, 131: 1737-1747
- Pfanner N, Geissler A (2001). Versatility of the mitochondrial protein import machinery. Nat Rev Mol Cell Biol, 2: 339-349
- Pfanner N, Wiedemann N, Meisinger C, Lithgow T (2004). Assembling the mitochondrial outer membrane. Nat Struct Mol Biol, 11: 1044-1048
- Popov-Celeketi D, Mapa K, Neupert W, Mokranjac D (2008). Active remodelling of the TIM23 complex during translocation of preproteins into mitochondria. EMBO J, 27 (10): 1469-1480
- Rassow J, Dekker PJ, van Wilpe S, Meijer M, Soll J (1999). The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. J Mol Biol, 286: 105-120
- Rehling P, Wiedemann N, Pfanner N, Truscott KN (2001). The mitochondrial import machinery for preproteins. Crit Rev Biochem Mol Biol, 36: 291-336

- Schatz G (2007). The magic garden. *Annu Rev Biochem*, 76: 673~678
- Tang CR, Huang DB, Yang JH, Liu SJ, Sakr S, Li HP, Zhou YH, Qin YX (2010). The sucrose transporter HbSUT3 plays an active role in sucrose loading to laticifer and rubber productivity in exploited trees of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Cell Environ*, 33: 1708~1720
- Truscott KN, Kovermann P, Geissler A, Merlin A, Meijer M, Driessen AJ, Rassow J, Pfanner N, Wagner R (2001). A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by TIM23. *Nat Struct Biol*, 8 (12): 1074~1082
- Venkatachalam P, Thulaseedharan A, Raghothama KG (2009). Molecular identification and characterization of a gene associated with the onset of tapping panel dryness (TPD) syndrome in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell.) by mRNA differential display. *Mol Biotechnol*, 41: 42~52
- Wang Y, Carrie C, Giraud E, Elhafez D, Narsai R, Duncan O, Whelan J, Murcha MW (2012). Dual location of the mitochondrial preprotein transporters B14.7 and Tim23-2 in complex I and the TIM17:23 complex in *Arabidopsis* links mitochondrial activity and biogenesis. *Plant Cell*, 24 (6): 2675~2695
- Zhang QQ, Zhu JH, Ni YM, Cai YB, Zhang ZL (2012). Expression profiling of *HbWRKY1*, an ethephon-induced *WRKY* gene in latex from *Hevea brasiliensis* in responding to wounding and drought. *Trees*, 26: 587~595